

Influência do pH, Concentração de Carvão Ativado e Volume de Meio Nutritivo sobre a Multiplicação in vitro de Palma-Forageira [*Opuntia tuna* (L.) Mill.]



ISSN 1808-9968

Dezembro, 2016

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Semiárido

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 129

**Influência do pH, Concentração
de Carvão Ativado e Volume
de Meio Nutritivo sobre a
Multiplicação in vitro de
Palma-Forageira [*Opuntia
tuna* (L.) Mill.]**

Juliana Martins Ribeiro

Silvio Lopes Teixeira

Embrapa Semiárido

Petrolina, PE

2016

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE

Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Flávio de França Souza

Secretária Executiva: Lúcia Helena Piedade Kiill

Membros: Diana Signor Deon

Fernanda Muniz Bez Biolo

Francislene Angelotti

Gislene Feitosa Brito Gama

José Maria Pinto

Juliana Martins Ribeiro

Mizael Félix da Silva Neto

Pedro Martins Ribeiro Júnior

Rafaela Priscila Antonio

Roseli Freire de Melo

Saete Alves de Moraes

Supervisor editorial: Sidinei Anunciação Silva

Revisor de texto: Sidinei Anunciação Silva

Normalização bibliográfica: Sidinei Anunciação Silva

Foto da Capa: Juliana Martins Ribeiro

Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição (2016):

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP - Brasil. Catalogação na publicação

Embrapa Semiárido

Ribeiro, Juliana Martins.

Influência do pH, concentração de carvão ativado e volume de meio nutritivo sobre a multiplicação in vitro de palma-forrageira [*Opuntia tuna* (L.) Mill.] / Juliana Martins Ribeiro, Sílvio Lopes Teixeira. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

20 p.: il. color. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 129).

1. Micropropagação. 2. Produção de mudas. 3. Biotecnologia. 4. Cultura de tecidos. 5. Planta forrageira. I. Ribeiro, Juliana Martins. II. Teixeira, Sílvio Lopes. III. Título. IV. Série.

CDD 633.2

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões	17
Referências	18

Influência do pH, Concentração de Carvão Ativado e Volume de Meio Nutritivo sobre a Multiplicação in vitro de Palma-Forrageira [*Opuntia tuna* (L.) Mill.]

*Juliana Martins Ribeiro*¹

*Silvio Lopes Teixeira*²

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de otimizar o protocolo de clonagem in vitro de palma por meio de testes com pH, uso de carvão ativado e volume de meio de cultura que ainda não haviam sido testados para essa espécie. Para verificar o efeito do pH do meio de cultura sobre o desenvolvimento in vitro da palma, foram testados os pHs de 3,7; 4,7; 5,7; 6,7 e 7,7. O efeito do carvão ativado sobre o desenvolvimento in vitro de palma foi avaliado testando-se as concentrações 0 mg L⁻¹; 40 mg L⁻¹; 80 mg L⁻¹; 160 mg L⁻¹; 320 mg L⁻¹. O efeito do volume de meio nutritivo sobre o desenvolvimento in vitro de palma foi avaliado por meio do enchimento dos frascos de cultivo (medindo 9 cm de altura x 8 cm de diâmetro da boca x 7 cm de diâmetro de fundo) com os volumes de meio nutritivo de 30 mL; 40 mL; 50 mL; 60 mL; 70 mL. Foi observado que os pHs de 3,7 e 4,7,

¹Bióloga, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Botânica, professor aposentado da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

bem como o emprego de 320 mg L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura e 70 mL de meio nutritivo por frasco permitiram a obtenção da maior taxa de multiplicação.

Termos para indexação: micropropagação, cactácea, cochonilha, Semiárido.

Influence of pH, Activated Charcoal Concentration and Volume of Nutrient Medium on the in vitro Multiplication of Cactus [*Opuntia tuna* (L.) Mill.]

Abstract

The present study aimed to optimize the existing protocol, by testing pH, activated charcoal and volume of the culture medium, which had not yet been tested for the aforementioned species. To verify the effect of the pH of the culture medium on in vitro development of palm tested were used pHs of 3.7 ; 4.7; 5.7 ; 6.7 and 7.7 . The effect of activated charcoal on the in vitro development of palm was evaluated by testing concentrations 0; 40; 80; 160; 320 mg L⁻¹. The effect of the nutrient medium volume on the in vitro development of palm was evaluated by filling the culture flasks with volumes of nutrient medium 30 ; 40; 50 ; 60 ; 70 ml . It was observed that the pHs 3,7 and 4.7 as well as the use of 320 mg L⁻¹ of activated charcoal in the culture medium and 70 mL of nutrient medium per flask, allowed to obtain the best results.

Index terms: micropropagation, cactaceae, cochineal, Semiárid.

Introdução

A palma-forrageira [*Opuntia tuna* (L.) Mill.] foi introduzida no Brasil no século 19 a fim de servir de alimento para a cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp. - Hemiptera, Dactylopiidae), inseto usado na obtenção de corantes naturais (BARBERA, 2001). Entretanto, com o advento dos corantes sintéticos, a palma passou a ser utilizada na alimentação humana e animal, medicina, indústria de cosméticos, proteção e conservação do solo, fabricação de adesivos, colas, fibras para artesanato, papel, corantes, mucilagem, antitranspirantes e ornamentação (CHIAICCHIO et al., 2006).

Na região Nordeste, a palma-forrageira, não somente o gênero *Opuntia*, mas também o *Nopalea*, tem sido largamente utilizada objetivando a suplementação da dieta dos animais nos períodos críticos do ano. Essa cultura tem se mostrado bem adaptada às condições do Semiárido, suportando grandes períodos de estiagem, por causa de propriedades fisiológicas, caracterizadas por processo fotossintético eficiente (SANTOS et al., 2006). Contudo, em algumas localidades dos estados da Paraíba, Pernambuco e Ceará, onde a palma é cultivada, as plantas vêm sendo atacadas pela cochonilha-do-carmim, provocando perda significativa em sua produção. Os métodos mais utilizados para o controle da cochonilha incluem a utilização de variedades resistentes (VASCONCELOS et al., 2002), sendo duas do gênero *Nopalea* (Palma Doce ou Miúda e Palma IPA Sertânea ou Baiana – *Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) e uma do gênero *Opuntia* (Palma Orelha de Elefante Mexicana - *Opuntia tuna* (L.) Mill). Além do uso de variedades resistentes, existe o controle biológico e o uso de defensivos químicos alternativos, porém, essas abordagens se encontram em fase experimental e, no caso de defensivos químicos, até o momento não há inseticidas registrados para esta finalidade.

A alternativa de controle da cochonilha por meio do plantio de cultivares resistentes já vem sendo utilizada, porém, em pequena escala. Isso ocorre por causa da morosidade da técnica convencional de estaquia, por meio de cladódios, que rende cerca de oito mudas

em 60 dias (LIMA, 2013). O uso de técnicas de cultura de tecidos é a alternativa viável para se atingir este objetivo, a mesma já é utilizada, mas em pequena escala, para a multiplicação da palma. A taxa de rendimento é variável, podendo chegar a 6,4 brotações em 30 dias (MOHAMED-YASSEEN et al., 1995); 12 brotações com 30 dias e 16 com 60 dias (ALVES et al., 2013) e de 12 a 17 brotações em 45 dias (FLINT et al., 2013).

O pH do meio nutritivo é importante para a obtenção de culturas in vitro de várias espécies e para a absorção de nutrientes pelas plantas, tendo sido avaliada sua influência no desenvolvimento in vitro de fungos (MONTARROYOS et al., 2007), microalgas (KARAM; SOCCOL, 2007) e tangerina (PASQUAL et al., 2002). É sabido que a acidificação do meio nutritivo, caso atinja valores inferiores a um pH de 4,5, pode resultar na hidrólise do agente gelificante, fazendo com que o mesmo não polimerize ao esfriar, afetando assim a consistência do meio (BARROS; PASQUAL, 1992; COUSSON; THANH, 1981; GEORGE; SHERRINGTON, 1984; PASQUAL et al., 1992; SHINGA, 1982; SKIRVIN et al., 1986).

Quanto ao carvão ativado, sua adição ao meio de cultura pode resultar tanto em efeitos positivos quanto negativos. Em relação aos efeitos positivos, podem ser mencionadas a formação de ambiente escuro para as raízes e a adsorção de substâncias inibitórias do desenvolvimento das plantas como fenóis e etileno (DIAS et al., 2013; SARTOR et al., 2013; THOMAS, 2008). Quanto aos efeitos negativos do carvão ativado, podem ser destacados a adsorção de reguladores vegetais, vitaminas e outras substâncias orgânicas importantes para o desenvolvimento in vitro das plantas. O carvão ativado pode ainda liberar substâncias naturalmente presentes ou adsorvidas por ele (COSTA et al., 2006; MOURA et al., 2008; PAN; STADEN, 1998). De acordo com Ebert e Taylor (1990), o carvão ativado tem um elevado efeito na adsorção de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura.

Em relação à influência do volume de meio na formação de órgãos in vitro, Mendes et al. (2013) verificaram a influência no número de

explantes e volume de meio nutritivo sobre o desenvolvimento de raízes em microestacas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Da mesma forma, Reis et al. (2003) observaram o efeito de diferentes volumes de meio de cultivo e tamanhos de explantes na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Brot. Stokes) in vitro. Camolesi et al. (2010) constataram a influência do tamanho do frasco e do volume do meio nutritivo sobre o desenvolvimento in vitro de bananeira 'Maçã'.

Considerando que os fatores citados podem afetar a taxa de multiplicação in vitro da palma-forrageira e que os mesmos ainda não foram testados para a propagação in vitro de *Opuntia tuna*, objetivou-se, com este trabalho, otimizar o protocolo de clonagem da palma-forrageira, avaliando-se pela primeira vez a influência do pH, da presença de carvão ativado no meio de cultura e o volume de meio nutritivo no frasco uma vez que não se encontrou nada na literatura a respeito.

Material e Métodos

O material vegetal utilizado para a realização de todos os experimentos foi proveniente de culturas estoque de palma-forrageira mantidas por passagens de 120 dias, em sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}$. O meio nutritivo utilizado para a manutenção da cultura estoque foi preparado de acordo com a formulação de sais inorgânicos de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitaminas (WHITE, 1943), $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de mio-inositol, $6,50 \text{ g L}^{-1}$ de ágar, $30,0 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP), $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA), pH 5,9 (aferido antes da adição do ágar) dispensado em potes de polipropileno, medindo 9 cm de altura x 8 cm de diâmetro da boca x 7 cm de diâmetro de fundo à base de 30 mL por pote frasco, e esterilizado por autoclavagem (121 °C, 1,05 atm de pressão, por 20 minutos).

A composição do meio nutritivo, tanto para a manutenção das culturas estoque, quanto nos tratamentos testados, incluindo a adição da

citocinina BAP e da auxina ANA, seguiram a técnica padrão adotada para a micropropagação de palma no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido. Nos três experimentos, tanto a composição do meio nutritivo quanto as condições de crescimento, foram as mesmas descritas para a cultura estoque, exceto quanto aos fatores testados, que foram modificados de acordo com cada ensaio.

Os explantes utilizados para a instalação dos experimentos foram constituídos de segmentos de ramos de cerca de 2 cm de comprimento, oriundos de brotações já estabelecidas na cultura estoque.

Para verificar o efeito do pH do meio de cultura sobre o desenvolvimento in vitro da palma, foram utilizados os seguintes tratamentos (pH): T1: 3,7; T2: 4,7; T3: 5,7; T4: 6,7; T5: 7,7. Esses tratamentos foram adotados tomando por base o pH de 5,7, que é o normalmente utilizado para o cultivo in vitro de várias espécies.

Para verificar o efeito do carvão ativado sobre o desenvolvimento in vitro de palma, foram utilizadas as seguintes concentrações (mg L^{-1}): T1: 0; T2: 40; T3: 80; T4: 160; T5: 320. As variações da concentração de carvão ativado foram definidas a partir valores normalmente utilizados no cultivo in vitro de várias espécies.

O efeito do volume de meio nutritivo sobre o desenvolvimento in vitro de palma foi avaliado por meio do enchimento dos frascos de cultivo com diferentes volumes de meio nutritivo, como segue: T1: 30; T2: 40; T3: 50; T4: 60; T5: 70 (mL), tendo como controle o T1, com 30 mL de meio e 12 explantes por pote, que é a técnica padrão utilizada para a micropropagação de palma no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido.

No experimento do pH foram avaliados número médio de brotos e massa da matéria fresca. No caso do carvão ativado, foram avaliados massa da matéria fresca, número e comprimento médio de brotos acima de 2 cm. Quanto ao volume de meio, foram avaliados número médio de brotos, massa da matéria fresca, além de número e comprimento médio de brotos acima de 2 cm por frasco de cultura, considerando ser esse o

comprimento mínimo ideal para a aclimatização das plantas no telado. O número médio de brotos foi avaliado contando-se todos os brotos formados a partir do explante inicial; a análise da massa da matéria fresca foi realizada em balança de precisão, pesando-se individualmente as plantas que estavam sendo cultivadas *in vitro*. O número e o comprimento médio de brotos acima de 2 cm foram avaliados pela contagem e medida apenas dos brotos com valores acima de 2 cm.

Para os experimentos de pH e carvão ativado, os dados foram registrados após 80 dias de cultivo dos explantes e, no experimento variando o volume de meio nutritivo nos frascos, o registro de dados ocorreu após 120 dias de cultivos dos explantes. Essa diferença entre os tempos para o coleta dos dados ocorreu em função dos volumes de meio nutritivo e do tipo de frasco utilizados em cada experimento. Para a avaliação do efeito do pH e da concentração de carvão, foram utilizados tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm contendo 20 mL de meio de cultura, enquanto aquele relacionado à influência da quantidade de meio nutritivo sobre o desenvolvimento das plantas foi conduzido em frascos de cultura de polipropileno, medindo 9 cm de altura x 8 cm de diâmetro da boca x 7 cm de diâmetro de fundo contendo 30 mL, 40 mL, 50 mL 60 mL e 70 mL de meio.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo os testes de pH e carvão ativado constantes de cinco tratamentos, cinco repetições e a unidade experimental composta de quatro tubos de ensaio, cada um com um explante. O experimento para a análise de volume de meio constou de cinco tratamentos, cinco repetições e a unidade experimental composta de quatro potes de cultura, de polipropileno, medindo 9 cm de altura x 8 cm de diâmetro da boca x 7 cm de diâmetro de fundo, cada um inoculado com 12 explantes. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa SAS for Windows, versão 9.2, 2002-2008.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os resultados referentes ao número médio de brotos e massa da matéria fresca (g) em função dos diferentes valores de pH avaliados. Tanto para o número médio de brotos quanto para a massa da matéria fresca, os pHs de 3,7 e 4,7 resultaram em valores superiores aos demais tratamentos, seguido de queda de desenvolvimento em pH a partir de 5,7.

Tabela 1. Número médio de brotos e massa da matéria fresca de palma [*Opuntia tuna* (L.) Mill.] em função dos diferentes valores de pH, aos 80 dias de cultivo. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, 2016.

pH	Nº médio de brotos	Massa da matéria fresca (g)
3,7	11,69 a	1,27 a
4,7	10,44 ab	1,31 a
5,7	4,17 c	0,37 b
6,7	5,57 bc	0,55 b
7,7	3,65 c	0,29 b
CV	39,42	39,84

Dados acompanhados de uma mesma letra na coluna são iguais segundo o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

A queda no desenvolvimento das culturas, observada a partir do pH 5,7, foi brusca, embora seja esse o pH usado convencionalmente nos meios de cultura de palma e de outras espécies. A qualidade visual das culturas continuou caindo à medida que os pHs se elevaram, tanto com relação à cor, que adquiriu tonalidade verde descolorida, quanto aos caules, aparentemente mais frágeis (Figura 1).

Foto: Juliana Martins Ribeiro.

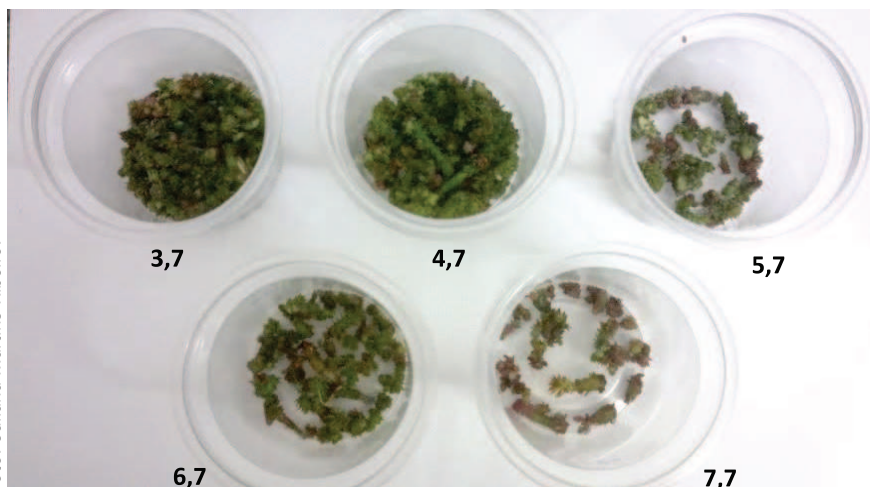


Figura 1. Aspecto das plantas submetidas aos diferentes valores de pH (3,7; 4,7; 5,7; 6,7 e 7,7) no meio nutritivo.

O pH 5,7 é considerado como aquele que permite o melhor aproveitamento dos nutrientes, para maioria das espécies. Para a palma-forrageira, porém, os pH de 3,7 e 4,7 são os mais favoráveis quanto às variáveis avaliadas.

Entre outros fatores, o pH do meio nutritivo é importante para a obtenção de culturas in vitro de várias espécies e para a absorção de nutrientes pelas plantas, sendo avaliada sua influência no desenvolvimento in vitro de fungos (MONTARROYOS et al., 2007), microalgas (KARAM; SOCCOL, 2007) e tangerina (PASQUAL et al., 2002). Sabe-se que a acidificação do meio nutritivo, caso atinja valores inferiores a um pH de 4,5, pode resultar na hidrólise do agente gelificante, fazendo com que o mesmo não polimerize ao esfriar, afetando assim a consistência do meio (BARROS; PASQUAL, 1992; COUSSON; THANH, 1981; GEORGE; SHERRINGTON, 1984; SHINGA, 1982; SKIRVIN et al., 1986; PASQUAL et al., 1992). Todavia, neste trabalho, por motivos ainda não conhecidos, o ágar gelificou em todos os pHs testados.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados referentes à massa da matéria fresca, número e comprimento médio de brotos acima de 2 cm, decorrentes das concentrações de carvão ativado no meio de cultura. Verificou-se ter havido diferença para todas as variáveis analisadas, em função das diferentes concentrações de carvão ativado adicionadas ao meio de cultura. Concentrações de carvão superiores a 80 mg L⁻¹ foram capazes de induzir, no máximo, um broto por explante, impossibilitando a análise estatística dessa variável. Não houve indução de brotos com comprimentos superiores a 2 cm sem a adição de carvão ativado ao meio de cultura.

Tabela 2. Massa da matéria fresca (g), número e comprimento (cm) médios de brotos acima de 2 cm de palma [*Opuntia tuna* (L.) Mill.] em função das diferentes concentrações de carvão ativado no meio de cultura, aos 80 dias de cultivo. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, 2014.

Concentração (mg L ⁻¹) de carvão ativado no meio de cultura	Massa da matéria fresca (g)	Nº médio de brotos acima de 2 cm	Comprimento médio (cm) de brotos acima de 2 cm
0	0,56 a	--	--
40	0,46 ab	0,44 b	2,14 b
80	0,19 c	0,5 ab	2,19 b
160	0,22 c	0,55 ab	2,15 b
320	0,28 bc	0,85 a	2,68 a
CV	35,23	35,07	7,24

Dados acompanhados de uma mesma letra na coluna são iguais segundo o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Os brotos induzidos em meios nutritivos sem carvão ativado apresentaram-se com comprimentos reduzidos, vários deles não se alongando acima de 2 cm, mas apenas formando calos intensamente na

base (Tabela 2). Ao contrário, à medida que aumentou a concentração de carvão ativado, houve uma tendência para aumento no número de brotos com comprimentos médios acima de 2 cm e redução gradativa da formação de calos, culminando com um maior valor dessa variável à concentração de 320 mg L⁻¹.

Plantas com maior número médio de brotos resultaram em menores comprimentos dos mesmos (Tabela 2). De acordo com Taiz e Zeiger (2004), de maneira geral, existe uma relação antagônica entre comprimento e número médio de brotos. Ribeiro e Teixeira (2008), Ribeiro et al. (2011) e Teixeira et al. (2008), analisando o cultivo in vitro de fáfia (*Pfaffia glomerata* L.), *Eucalyptus pellita* e *Sequoia sempervirens*, também observaram que as plantas que apresentaram maior número médio de brotos também eram aquelas que possuíam menores comprimentos médios dos mesmos.

Quanto aos dados relacionados com a influência do volume de meio nutritivo nos frascos de cultura, houve diferença para número total médio de brotos, massa da matéria fresca e número médio de brotos acima de 2 cm, mas não para o comprimento médio de brotos acima de 2 cm, provavelmente pela sua capacidade de adsorver componentes do meio de cultura, entre eles, reguladores de crescimento.

De acordo com os dados da Tabela 3, os maiores valores para número médio de brotos e número médio de brotos acima de 2 cm foram observados quando foram utilizados 60 mL e 70 mL de meio. Para a variável massa da matéria fresca, valores estatisticamente superiores foram observados quando se usou 70 mL de meio. Para a variável comprimento médio de brotos acima de 2 cm, não foi observada diferença significativa entre as médias. As quantidades de meio nutritivos de 30 mL e 40 mL não foram capazes de induzir brotos com comprimento superiores a 2 cm.

Tabela 3. Número médio de brotos, fresca, número médio de brotos acima de 2,0 cm e comprimento médio de brotos acima de 2 cm de palma [*Opuntia tuna* (L.) Mill.] em função dos diferentes volumes de meio nutritivo, aos 120 dias de cultivo. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, 2016.

Volume de meio nutritivo (mL/frasco)	Nº médio de brotos	Massa da matéria fresca (g)	Nº médio de brotos acima de 2 cm	Comprimento médio (cm) de brotos acima de 2 cm
30	16,4 c	4,03 c	-	-
40	26,75 c	4,81 c	-	-
50	51,42 b	10,91 b	1,4 b	2,45 a
60	65,0 ab	15,0 b	9,87 a	2,35 a
70	81,21 a	22,07 a	15,06 a	2,55 a
CV	26,86	22,81	39,42	9,16

Dados acompanhados de uma mesma letra na coluna são iguais segundo o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Não foi encontrado na literatura científica qualquer trabalho com palma avaliando a influência do volume na formação de órgãos pela planta. Reis et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes volumes de meio de cultivo e tamanhos de explantes na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Brot. Stokes) in vitro. Foram testados os volumes de 10 mL , 20 mL , 30 mL e 40 mL de meio nutritivo. Os autores observaram que os volumes de 30 mL e 40 mL foram significativamente superiores na indução de brotações.

Camolesi et al. (2010) avaliaram, entre outros parâmetros, a influência do tamanho do frasco e do volume do meio nutritivo sobre o desenvolvimento in vitro de bananeira Maçã. Para isso, nos frascos de 250 mL, foram adicionados 40 mL de meio de cultivo, e 60 mL de meio de cultivo foram adicionados nos frascos de 500 mL. Os autores observaram que frascos de 500 mL contendo 60 mL de meio nutritivo resultaram em maior taxa de multiplicação dos explantes. Da mesma forma, neste trabalho, o aumento do volume de meio favoreceu a formação de brotos em palma.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que, do ponto de vista econômico, será mais vantajoso empregar potes contendo 70 mL de meio de cultura, do que usar potes com menores quantidades de meio, já que o rendimento, em número de brotos por frasco, numa mesma área de prateleira será duas ou mais vezes maior, gastando-se a mesma quantidade de meio de cultura.

Conclusões

Meios de cultura ajustados para 3,7 e 4,7 possibilitam a maior formação de brotos e de biomassa fresca de *O. tuna* durante a fase de multiplicação *in vitro*.

A concentração de carvão ativado no meio nutritivo não deve ultrapassar 40 mg L⁻¹, para a multiplicação de *O. Tuna*.

Quando a finalidade da cultura objetivar o alongamento do brotos, a concentração de carvão ativado no meio nutritivo deve ser de 320 mg L⁻¹.

Frascos contendo 70 mL de meio de cultura e 12 explantes de *O. tuna* por frasco, do ponto de vista econômico, são os mais indicados para a manutenção da cultura.

Agradecimentos

À Facepe, ao CNPq e à Embrapa Semiárido pelo suporte financeiro e à Raimundo Parente de Oliveira, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Referências

- ALVES, F. A. L.; SOARES, W. S.; FERNANDES, Y. T. D, RÊGO, M. M. Efeito de benziladenina na regeneração de duas variedades de palma forrageira (*Opuntia* spp.). **Scientia Plena**, Aracaju, v. 9, n. 6, p. 1-8, 2013.
- BARBERA, G. História e importância econômica e agroecologia. In: BARBERA, G.; INGLESE, P. (Ed.). **Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira**. [João Pessoa]: Sebrae-PB, 2001. p. 1-11.
- BARROS, I.; PASQUAL, M. Variação do pH do meio MS de cultura *in vitro* como função da concentração de agar e do pH inicial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 11, p. 1.513-1.517, 1992.
- CAMOLESI, M. R.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J.; MARTINS, N. A. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 40, n. 2, p. 255-260, 2010.
- CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o Semi-Árido baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 39-49, 2006.
- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- COUSSON, A.; THANH, K. T. van. *In vitro* control of *de novo* flower differentiation from tobacco thin cells layers cultured on a liquid medium. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v.51, p.77-84, 1981.
- DIAS, M. M.; NIETSCH, S.; PEREIRA, M. C. T. Carvão ativado e estiolamento no estabelecimento *in vitro* de romãzeira. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2013.
- EBERT, A.; TAYLOR, H. F. Assessment of the changes of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Cham, n. 20, p. 165-172, 1990.
- FLINT, A. el; BOULLANI, R. el; AIT AABD, N.; MSANDA, F.; SERGHINI, M. A.; MOUSADIK, A. el. In vitro propagation of three Moroccan prickly pear cactus *Opuntia* and plant establishment in soil. **Notulae Scientiae Biologiae**, Cluj-Napoca, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2013.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Eastern Press, 1984. 709 p.

KARAM, L. M.; SOCCOL, C. R. The effect of temperature and pH in the *Spirulina major* cultivation. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 5-7, 2007.

LIMA, W. B. de. **Propagação por fracionamento do cladódio de palmas forrageiras resistentes a cochonilha-do-carmim**. 2013. 45 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

MENDES, M. I. S.; SANTOS, K. C. F.; SOUZA, A. S.; VIDAL, A. M.; SOUZA, K. A. Influência do número de explante e do volume do meio de cultura na micropropagação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 15., 2013, Salvador. **Inovação e sustentabilidade: da raiz ao amido**. Salvador: CBM: Embrapa, 2013. 1 CD-ROM.

MOHAMED-YASSEEN, Y.; BARRINGER, S. A.; SPLITTSTOESSER, W. E.; SCHNELL, R. J. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Cham, v. 42, p. 117-119, 1995.

MONTARROYOS, A. V. V.; COELHO, R. S. B.; FERRAZ, G. M. G.; SANTOS, R.; SANTOS, V. F.; ANDRADE, P. P. Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 86-89, 2007.

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C.; LEMOS, O. F. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 38, n. 1, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000100012> . Acesso em: 15 nov. 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, Cham, v. 26, p. 155-163, 1998.

PASQUAL, M.; RIBEIRO, V. G.; BARROS, I. Influência da chapa aquecedora e autoclave sobre o pH do meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 4, p. 603-608, 1992.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’ em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; CORRÊA, R. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ARANTES, E. S.; LAMEIRA, O. A. Avaliação de diferentes volumes de meio de cultivo e tamanhos de explantes na multiplicação de ipeca [*Psychotria ipecacuanha* (Brot. Stokes) *in vitro*]. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43., 2003, Recife. **Resumos expandidos...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Olericultura, 2003. p. 1-4.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L. Substituição de nitrato de potássio (PA) por salitre potássico no preparo de meio de cultura de tecidos vegetais esterilizado com hipoclorito de sódio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1.209-1.213, 2008.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D. C. Cultivo *in vitro* de *Sequoia sempervirens* L. em meio de nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 21, n. 1, p. 79-84, 2011.

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARRUDA, G. P.; COELHO, R. S. B.; DIAS, F.; MELO, J. N. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco**. Recife, IPA, 2006. 48 p. (IPA. Documento, 30).

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Umuarama, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SHINGA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. **Journal of American Society for Horticultural Science**, [Alexandria], v. 107, p. 657-660, 1982.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, Cham, v. 5, p. 292-294, 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 26, p. 618-631, 2008.

VASCONCELOS, A. G. V.; LIRA, M. A.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; SANTOS, M. V. F. (2002) Seleção de clones de palma forrageira resistente à cochonilha do carmim (*Dactylopius* sp.) In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 39, 2002, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia/UFRPE, 2002. CD Rom.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, Lakeland, v. 7, p. 53-65, 1943.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE 13439